



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

O Papel dos Disruptores Endócrinos na Etiopatogenia do AVC Uma revisão

José Carlos Pereira Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Professora Doutora Cecília Santos

Covilhã, Março de 2015

Dedicatória

Dedico esta tese à minha mãe, incomparável lutadora, a quem devo tudo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Cecília Santos por, desde o meu 3.º ano, me ter acompanhado e me ter dado todo o apoio necessário à realização deste trabalho e à integração no mundo científico que desde sempre apreciei.

Um obrigado muito especial, também, a toda a equipa do CICS que me acompanhou, nomeadamente, à Dra. Telma Quintela, à Dra. Isabel Gonçalves, à Filipa e à Cláudia.

À minha mãe, sem a qual nada disto seria possível e que foi e sempre será a maior responsável pelo meu sucesso.

Ao meu Paidrinho e à Sónia, ao tio Francisco e à tia Marília, pedras basilares na construção deste percurso.

À minha Madrinha, por desde cedo me ter incentivado o gosto pela ciência e por me ter dado motivação para ir sempre mais à frente.

Aos meus tios, aos meus primos, aos meus avós, pelo apoio incessante e pela exigência que sempre me fizeram honrar.

Aos meus amigos, à Ana Luísa, ao Simão, ao João Fernando, à Sara, à Joana, à Micaela, à Carla, à Tatiana, à Beatriz, ao João Pedro, ao Élvio, ao Arouca, à Ana, ao Miguel, à Cláudia, por me terem feito sempre sentir amado, acarinhado e apoiado.

Ao João Castro, pela paciência, pelo companheirismo, pela lealdade e por me mostrar que, mesmo quando se quer conquistar o mundo, ainda há tempo e espaço para se ser feliz.

A Deus, ou a qualquer entidade divina ou fora dos limites da minha percepção, por me ter colocado os obstáculos e as oportunidades exactamente no sítio certo para poder progredir.

Resumo

Os acidentes vasculares cerebrais são uma das principais causas de morbi-mortalidade nos países desenvolvidos sendo uma realidade com graves consequências médicas, sociais e económicas. Vários estudos relatam o importante papel das hormonas sexuais na incidência e resposta biológica do organismo a esta patologia pelo que se torna crucial compreender quais as consequências que a disfunção destes eixos pode ter na mesma.

Objectivos: Rever o papel dos estrogénios e androgénios na etiopatogenia do AVC; Rever o papel da epigenética na etiopatogenia do AVC; Rever o conceito de disruptor endócrino e o seu potencial papel na saúde e na doença; Rever o papel dos disruptores endócrinos na etiopatogenia do AVC, quer a nível da desregulação hormonal quer a nível do seu impacto epigenético.

Metodologia: Leitura e análise de artigos publicados acerca do tema, nos últimos 5 anos, na base de dados do site pubmed.com.

Palavras-chave

Acidente Vascular Cerebral, Etiopatogenia, Disruptores endócrinos, Hormonas sexuais.

Abstract

Stroke is one of the major causes of mobility and mortality in developed countries having severe medical, social and economic consequences.

Several studies correlate the level of sexual hormones with the incidence of vascular disease and with the biological response after stroke. Therefore it's crucial to understand how disruption of hormonal homeostasis can influence the pathophysiology of this disease.

Objectives: Review the role of estrogens and androgens in stroke pathophysiology; Review the role of epigenetics in stroke pathophysiology; Review the endocrine receptor concept and its role in health and disease; Review the role of endocrine disruptors in stroke pathophysiology, concerning its contribution to hormonal deregulation and its epigenetic impact.

Methodology: Reading and analysis of articles concerning this theme, of the last 5 years, in pubmed.com database.

Keywords

Stroke; Pathophysiology; Endocrine disruptors; Sexual hormones;

Índice

Introdução.....	1
AVC: Conceitos Gerais	2
1.1. Definição	2
1.2. Epidemiologia	2
Fisiopatologia do AVC	4
2.1 O conceito de foco isquémico e zona de penumbra	4
2.2. A cascata isquémica.....	4
2.2.1. Alteração do metabolismo celular.....	5
2.2.2. Excitotoxicidade	5
2.2.3. Stress oxidativo	5
2.2.4. Alteração da permeabilidade da BHE	6
2.2.5. Alterações microvasculares.....	7
2.2.6. Alterações da hemostase.....	7
2.2.7. Alterações inflamatórias	8
2.2.8. Morte celular induzida pela isquémia.....	9
2.3 Mecanismos neuroprotectores	9
2.3.1 Factores de crescimento neuronal	10
2.3.2 Neurogénese e angiogénese	10
Diferenças sexuais na etiopatogenia do AVC.....	11
3.1 Mecanismos hormonais.....	11
3.1.1 O estradiol	11
3.1.1.1 Vias de sinalização dependentes de receptor	12
3.1.1.2 Vias de sinalização independentes de receptor.....	13
3.1.1.3 O papel do estrogénio na inflamação	13
3.1.1.4 O papel do estrogénio na hemostase	14
3.1.1.5 O papel do estrogénio na BHE.....	15
3.1.1.6 O papel do estrogénio no endotélio vascular	15
3.1.1.7 O papel do estrogénio no Homem	16
3.2 Mecanismos não hormonais	16
3.2.1 Diferenças na resposta à lesão	16
3.2.2 Diferenças na via de morte celular.....	17
O papel da epigenética na etiopatogenia do AVC.....	18

O papel dos disruptores endócrinos na etiopatogenia do AVC	20
5.1 Conceitos gerais.....	20
5.2 Os disruptores endócrinos e o estradiol	21
5.3 Os disruptores endócrinos e o AVC	22
5.3.1 Efeitos nas células neuronais.....	23
5.3.2 Efeitos na inflamação.....	24
5.3.3 Efeitos nas células endoteliais	25
5.3.4 Efeitos na angiogénese e na sinaptogénese.....	25
5.3.5 Efeitos epigenéticos.....	26
Conclusão	27
Referências Bibliográficas.....	28

Lista de Acrónimos

17 β -HSD	17 β -desidrogenase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPA	5-metil-4-propionato
AP-1	Proteína activadora-1
APAF	Factor activador da peptidase apoptótica
AQP	Aquaporina
AR	Receptor de androgénios
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Factor neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BPA	Bisfenol A
Ca ²⁺	Cálcio
CCL5/RANTES	Quimiocina tipo CC tipo 5
Cdk-5	Cinase 5 dependente de ciclinas
Cl ⁻	Cloreto
COX	Cicloxigenase
CpG	Citosina - fosfato - guanina
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta do cAMP
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DE	Disruptores endócrinos
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
ER	Receptor de estrogénio
ERK	Cinase regulada pela sinalização extracelular
FGF	Factor de crescimento derivado dos fibroblastos
G-CSF	Factor estimulador da colónia dos granulócitos
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
GPR30/GPER	Receptor de estrogénio associado à proteína G
HIF-A	Factor α 1 induzido pela hipoxia
HMG-1	Grupo proteico de alta mobilidade-1
HSP70	Proteína de choque térmico-70
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Factor de crescimento derivado da insulina-1
IL	Interleucina
INF	Interferão
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível

IP-10	Proteína induzida pelo interferão gama-10
JNK	Cinase do terminal amínico da proteína c-Jun
K+	Potássio
MAPK	Cinase activada por mitogéneo
MCP-1	Proteína quimiotácica de monócitos-1,
MeCP2	Proteína ligante a metil-CpG
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófagos-1 α
MMP	Metaloproteinase da matriz
mRNA	RNA mensageiro
Na+	Sódio
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal
NOS	Sintase de óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
ON	Óxido nítrico
PARP	Poli(ADP-ribose)polimerase
PCB	Bisfenil policlorado
PCB	Proteína cinase B
PCB/PI3K	Fosfocinase B/fosfatidilinositol-3 cinase
PCC	Proteína cinase C
PrPc	Proteína priónica
SDF-1 α	Factor 1 α derivado de células do estroma
STAT-1	Activador da transcrição e transdutor de sinal-1
TNF	Factor de necrose tumoral
TXA2	Tromboxano A2
UBI	Universidade da Beira Interior
VCAM-1	Molécula de adesão vascular celular-1
VEGF	Factor de crescimento derivado do endotélio vascular
Zn ²⁺	Zinco

Introdução

Os acidentes vasculares cerebrais são uma das principais causas de morbi-mortalidade nos países desenvolvidos sendo uma realidade com graves consequências médicas, sociais e económicas.¹

Constituindo uma das principais causas de incapacidade no mundo e mais especificamente em Portugal continua a ser um verdadeiro desafio para as equipas multidisciplinares que abordam esta patologia sendo necessária uma constante aposta na melhoria da sua prevenção, diagnóstico e tratamento.

Para que se consiga uma melhor intervenção é crucial uma compreensão profunda dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos, investigação que nos dará pistas para a descoberta de novos factores que contribuam para a sua elevada incidência, novas formas de personalizarmos o tratamento aos pacientes de acordo com as suas características biológicas específicas e de novos fármacos que permitam uma melhor resposta face à mesma.

Algo curioso acerca desta doença cerebrovascular, e que constitui o ponto de partida desta revisão, é o facto de apresentar uma epidemiologia variável conforme o sexo, relativamente quer à incidência quer à mortalidade associada.¹

Este facto remete-nos para um possível papel das hormonas sexuais na etiopatogenia do AVC, o que poderá explicar a susceptibilidade individual variável e a diferente resposta celular desencadeada conforme o sexo.²

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos neste sentido comprovando a influência dos eixos hormonais no aparecimento e desenvolvimento da doença, evidência que nos lança novos e mais complexos desafios no sentido de perceber até que ponto é que a disfunção destes eixos pode ser relevante e ter um impacto importante.

Desta forma, surgiu o interesse de estudar o papel dos disruptores endócrinos na fisiopatologia deste problema, uma vez que os mesmos ao alterarem os padrões de secreção e de biodisponibilidade das hormonas endógenas podem, directa e/ou indirectamente, influenciar a resposta biológica à mesma.

Assim, este trabalho pretende, então, fazer uma revisão dos artigos publicados nos últimos anos acerca do papel dos disruptores endócrinos na etiopatogenia do AVC de forma a perceber através de que mecanismos é que esta possível influência se desenvolve.

AVC: Conceitos Gerais

1.1. Definição

Pode definir-se AVC como uma alteração neurológica focal ou global, de início súbito e de presumível origem vascular.

Os dois principais mecanismos que produzem a lesão cerebral e que servem para uma classificação básica desta patologia são a isquémia e a hemorragia.

Os AVCs isquémicos correspondem a cerca de 80% das etiologias e devem-se a fenómenos de trombose, embolismo ou isquémia global associada a hipotensão. É, essencialmente, neste tipo de acidente vascular cerebral que esta revisão irá incidir.

Por sua vez, os AVCs hemorrágicos que representam cerca de 10-15% das causas estão relacionados com rupturas vasculares não traumáticas.

Em ambos os casos, a resposta celular e tecidual a estas alterações está na base das graves consequências clínicas observadas.³

1.2. Epidemiologia

Os AVC's constituem uma das principais causas de mortalidade nos países desenvolvidos sendo que mesmo quando não levam à morte imediata ou em algumas horas do doente acometido constituem, a longo prazo, uma das maiores causas de incapacidade tornando-se, assim, num flagelo ao nível da saúde pública mundial.¹

Em Portugal, estima-se que a sua incidência global seja de, aproximadamente, 8%.⁴

Quanto à mortalidade, os dados mais recentes revelam que houve cerca de 13020 óbitos em 2012, o que representa uma queda progressiva de cerca de 7% desde 2008.⁵

Em relação à taxa de mortalidade padronizada por 100.000 habitantes, a mesma é de cerca de 71,2% em indivíduos com idade superior a 65 anos e de 12,2% em indivíduos com idade inferior a 65 anos, o que representa uma diminuição de quase 20% em relação aos dados recolhidos em 2007.⁵

Este facto poderá ser explicado pela implementação de programas de saúde específicos de combate a esta patologia ao nível da prevenção e controlo dos factores de risco modificáveis e da sua abordagem ao nível hospitalar ("Via Verde AVC").

Relativamente às diferenças nas variáveis epidemiológicas entre sexos, é de salientar que enquanto a incidência é ligeiramente superior nos homens, as taxas de mortalidade são superiores nas mulheres. Isto deve-se ao facto, numa primeira análise, de apresentarem uma idade superior à data do 1.º AVC e de possuírem comorbilidades cardiovasculares em maior número e de maior gravidade.¹

Fisiopatologia do AVC

O AVC isquémico pode resultar, conforme referido anteriormente, de um mecanismo trombótico, embólico ou relacionado com um estado de hipoperfusão geral. Em qualquer um dos casos, a privação de oxigénio a que são sujeitas as células neuronais e o rápido compromisso do seu metabolismo aeróbio irão estar na base das lesões observadas.

É de salientar que a gravidade das lesões dependerá da duração da hipóxia, da localização da região afectada (sendo possível a existência, em algumas regiões, de uma circulação colateral que permita a nutrição, ainda que parcial, da zona acometida) e da existência de comorbilidades, principalmente vasculares e/ou endócrinas.³

2.1 O conceito de foco isquémico e zona de penumbra

De um ponto de vista topográfico, pode identificar-se a zona de parênquima afectado que sofre morte imediata, o foco isquémico, e uma zona circulante, a zona de penumbra, com algum potencial de recuperação.

As células no foco isquémico são rapidamente destruídas por lipólise, proteólise, desagregação dos microtúbulos, falha do sistema bioenergético celular e quebra, consequente, da homeostasia iónica.⁶ A zona de penumbra localiza-se entre o foco isquémico e a massa neuronal não lesionada. Sofre alteração da perfusão sanguínea mas o metabolismo das células desta zona não sofre alterações relevantes.⁶

2.2. A cascata isquémica

A zona de penumbra é crucial no desenvolvimento dos processos fisiopatológicos associados ao AVC pois é a partir daqui que se inicia e progride a cascata isquémica, um conjunto de complexos processos bioquímicos sequenciais que resultarão na necrose e/ou apoptose neuronal. Assim sendo, a compreensão dos processos despoletados pela activação desta cascata é de primordial importância para o desenvolvimento de terapêuticas que permitam a sua não activação ou a reversibilidade dos processos já iniciados, facto já comprovado laboratorialmente ser possível através de um aumento da perfusão ou de uma interferência directa na cascata.⁷

A cascata isquémica compreende os seguintes processos: hipoperfusão, alteração do metabolismo celular, excitotoxicidade, stress oxidativo, disfunção da barreira hematoencefálica, alterações microvasculares, alterações hemostáticas, alterações inflamatórias, morte celular e lesão cerebral de reperfusão.

2.2.1. Alteração do metabolismo celular

O tecido cerebral apresenta grandes necessidades metabólicas, nomeadamente de oxigénio e glicose, dependendo quase unicamente destes substratos para o seu funcionamento. O estado de hipoperfusão observado no AVC leva a uma diminuição da concentração de nutrientes disponíveis o que, em primeiro lugar, leva a uma quebra na produção de ATP. O défice de ATP compromete a função das bombas de Na⁺/Cl⁻ ATP-dependentes permitindo uma acumulação de K⁺ intracelular e a saída de Na⁺ da célula, o que resulta na sua despolarização.⁸ Consequentemente, ocorre activação dos canais somatodendríticos e de Ca²⁺ permitindo a libertação de aminoácidos excitatórios como o glutamato.⁸ Por outro lado, a diminuição da disponibilidade de oxigénio leva à necessidade dos neurónios realizarem metabolismo anaeróbio através da glicólise, facto que leva a produção e acumulação de lactato com potenciais efeitos prejudiciais.⁸

2.2.2. Excitotoxicidade

A excitotoxicidade refere-se à lesão secundária à activação dos neurónios e libertação de neurotransmissores excitatórios, principalmente o glutamato e o aspartato. O aumento da concentração de glutamato extracelular leva a activação de receptores tipo AMPA, kainato e NMDA, o que resulta no influxo de iões Na⁺, Cl⁻ e Ca²⁺ e consequente despolarização, que se propaga e permite a propagação da cascata.⁹ As alterações iónicas observadas levam, por outro lado, a um influxo de água levando a edema citotóxico.⁹ Para além disso, o Ca²⁺ intracelular, assumindo um papel de mensageiro secundário, activa um conjunto de enzimas proteolíticas e produtoras de radicais livres (fosfolipase A2, calpaína, endonucleases, ATPases, cicloxigenases e NO sintase tipo I) que degradam proteínas do citoesqueleto celular e da matriz extracelular levando, por outro lado, a lesão mitocondrial.¹⁰

Todas as alterações referidas induzem directamente morte celular por necrose embora, durante o processo, sejam, igualmente, activadas vias que levam à morte celular por apoptose.

2.2.3. Stress oxidativo

As espécies reativas de oxigénio e as moléculas de ON são importantes mediadores de lesão na fisiopatologia do AVC.

Relativamente às espécies reactivas de oxigénio, estas produzem-se inicialmente através da acumulação de xantinas (um metabolito do ATP) pela célula em hipoxia. Estes, ao serem metabolizadas no interior da célula, dão origem ao peróxido de hidrogénio uma molécula

lipossolúvel que facilmente atravessa a membrana, e que gera o radical OH, muito reactivo e principal causador de lesão.¹¹ Os radicais livres podem interagir com outras moléculas constituintes da célula e produzir novos radicais, sendo a formação do peroxinitrito, altamente reactivo e fonte de mais radicais OH, a partir do superóxido e do ON, um claro exemplo disso.¹¹ Os efeitos lesivos dos oxidantes são vários e diferenciados: a nível celular, levam à inactivação enzimática, libertação de Ca²⁺ a partir de reservatórios intracelulares, desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica, lesão do citoesqueleto e alteração no ADN. Ao nível da mitocôndria, ocorre disrupção da membrana mitocondrial interna e oxidação de proteínas que medeiam o transporte de electrões, o fluxo de H⁺ e a produção de ATP. Por outro lado, leva à libertação do citocromo P450 que desencadeia a via apoptótica. É de salientar, por outro lado, que este stress oxidativo intenso leva também a morte celular por necrose.¹² Para além destes efeitos locais, os oxidantes levam também a um aumento da permeabilidade da BHE¹³ e a um aumento da agregação plaquetária¹².

Quanto à produção de ON, o mesmo é produzido a partir de três tipos específicos de sintases de óxido nítrico, NOS I, II e III. A NOS I e II apresentam propriedades que potenciam a lesão cerebral sendo expressas principalmente pelas células neuronais (células da glia) e células inflamatórias, respectivamente.⁶ A isquémia e a libertação de mediadores inflamatórios levam a um aumento da actividade dos factores de transcrição NF-κB e STAT-1α estimulando, assim, a produção de ON por estas enzimas.⁶ Por sua vez, a produção de ON através da NOS III (eNOS), enzima expressa primariamente no tecido endotelial, apresenta efeitos benéficos, promovendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária e resposta inflamatória local, papéis importantes para a recuperação da hipoperfusão nas zonas de penumbra.⁶

2.2.4. Alteração da permeabilidade da BHE

A BHE é uma estrutura de primordial importância para o bom funcionamento do SNC proporcionando-lhe um ambiente privilegiado para a regulação da sua homeostasia e para a sua protecção face a substâncias potencialmente nocivas presentes na corrente sanguínea. A isquémia observada no AVC tem efeito também nesta barreira, conforme descrito anteriormente. As lesões observadas apresentam um padrão complexo e bifásico.¹⁴ As alterações mais precoces ocorrem entre as 2-24h após a ocorrência do acidente isquémico e caracterizam-se por desagregação da lâmina endotelial basal com consequente aumento da permeabilidade desta barreira.¹⁵ Tal fenómeno ocorre devido à acumulação de bradicinina, VEGF, trombina e MMP estimuladas pelo stress oxidativo.¹⁶ As alterações mais tardias ocorrem entre as 24-72h e devem-se, essencialmente, à actividade inflamatória (as quimiocinas libertadas pelas células inflamatórias aumentam directamente a permeabilidade da barreira), infiltração de leucócitos e libertação de MMP-9 por neutrófilos que, entretanto, conseguem penetrar a BHE danificada.¹²

A ruptura desta permite, também, por um lado, a entrada de substâncias para o parênquima cerebral, nomeadamente, de moléculas de alto peso molecular que exercem pressão oncótica e que levam, por um lado, à formação de edema e, por outro, ao extravasamento de eritrócitos e à transformação hemorrágica da zona afectada.¹² De salientar, por último, que o aumento de permeabilidade da BHE permite a migração de células inflamatórias que têm um importante papel na resposta inflamatória pós-isquémica, conforme será descrito adiante.¹⁷

2.2.5. Alterações microvasculares

Para além dos múltiplos efeitos nocivos na microvasculatura cerebral descritos anteriormente, a isquémia leva a perda da auto-regulação intrínseca do sistema arterial cerebral, fenómeno que permite manter uma pressão de perfusão cerebral aproximadamente constante não obstante as variações da pressão arterial sistémica.¹⁸ A mesma é conseguida através de processos metabólicos, miogénicos e endoteliais que levam à vasodilatação face a estímulos vasoconstritores potencialmente lesivos (hipóxia, acidose, etc).¹⁹ Está provado que a isquémia altera a dinâmica desta auto-regulação constitutiva²⁰ e, embora não se perceba completamente a razão, a mesma poderá dever-se a uma diminuição da expressão de NOS III e de prostaciclina e a um estímulo para a produção de endotelina II, um vasoconstritor potente ao qual os microvasos são particularmente sensíveis.¹² Em todo o caso, estas alterações irão prejudicar a reperfusão rápida da zona de penumbra, fenómeno imperativo para impedir a propagação da cascata isquémica.

2.2.6. Alterações da hemostase

A lesão endotelial permite a exposição do factor tecidual que inicia e propaga a cascata de coagulação culminando na formação de um coágulo a partir de agregados de fibrina, plaquetas, factores de coagulação e eritrócitos.¹² A trombina, uma das enzimas chave neste processo, isoladamente ou no complexo trombina/trombocalmodulina activa a procarboxipeptidase U, molécula que inibe a fibrinólise vascular basal. Observa-se uma diminuição expressiva desta enzima cerca de 72h após o AVC, o que mostra o estado de hipercoagulabilidade associado e a incapacidade intrínseca de reversão deste estado.²¹ É de assinalar, também, a libertação plaquetária de mediadores, como o tromboxano A₂, causadores de vasoespasmo, radicais livres e outros mediadores quimiotáxicos para os leucócitos que potenciam o fenómeno de não reperfusão.¹²

É, assim, notável o facto dos fenómenos trombóticos estarem associados ao AVC de duas formas: quer como uma das grandes etiologias deste processo quer enquanto fonte de mais lesão após o seu estabelecimento.

2.2.7. Alterações inflamatórias

A isquémia observada no AVC é seguida por uma complexa e intensa resposta inflamatória na qual participam tanto o sistema imunológico humoral quanto o sistema imunológico celular.¹²

As citocinas e quimiocinas são o mais importante motor e coordenador de toda a resposta inflamatória. Entre as citocinas destacam-se a IL-1 (a mais importante), o TNF α , o TGF β , HMG-1²², a IL-6 e a IL-10, a única com propriedades anti-inflamatórias e que se encontra em baixas concentrações após lesão isquémica.⁶ As quimiocinas mais importantes neste processo são a MCP-1, a MIP-1 α , a IL-8²³ (com um efeito pro ou anti-inflamatório dose-dependente), o complexo CCL5/RANTES²⁴, a IP-10²⁵ e a fractalkina.⁶

O início da resposta inflamatória deve-se, em primeiro lugar, à actividade de células neuronais específicas como astrócitos e microglia. Os astrócitos secretam citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras pró-inflamatórias que contribuem para a adesão e migração leucocitárias e induzem, também, a expressão de NOS.¹² A microglia, células macrofágicas do tecido cerebral, podem rapidamente diferenciar-se em fagócitos e produzir moléculas tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias sendo que são a principal fonte de IL-1 β , TNF α e TGF β .²⁶ Estas células, activadas anteriormente pelo ON, pelas espécies reactivas de oxigénio e por outras substâncias rapidamente produzidas após a lesão isquémica dão o "mote" para a segunda vaga da resposta inflamatória, protagonizada pelos neutrófilos, principalmente, e pelos linfócitos.¹²

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a infiltrarem-se na área isquémica e libertam, igualmente, moléculas pró-inflamatórias que amplificam, ainda mais, esta resposta em cascada. Os linfócitos infiltram-se dias mais tarde enquanto monócitos e têm um papel de menor importância. Estes leucócitos são uma importante fonte de MMP e ROS, comprovando, o seu carácter lesivo.⁶

Para esta migração celular contribui o dano observado na BHE e é necessário, em primeiro lugar, a expressão de moléculas que permitam a sua adesão e migração, fenómenos potenciados pelas quimiocinas e citocinas anteriormente descritas. Dentro destas salientam-se a E-selectina, a P-selectina, a ICAM1, a VCAM1 e, por último, as integrinas.⁶ Esta cascata inflamatória contribui para o aumento na expressão de outras enzimas, nomeadamente, de TXA-2, COX-2 e lipoxigenase que levam à produção de prostaglandinas e leucotrienos que contribuem para a lesão observada.¹²

Relativamente a alterações na expressão génica, observa-se a activação de numerosos factores de transcrição cujos produtos estão envolvidos na inflamação, nomeadamente, NF- κ B²⁷, MAPK e AP-cujos papéis na fisiopatologia do AVC ainda não estão claramente compreendidos.¹²

Por último, é importante referenciar o papel dos neuropeptídeos neste processo inflamatório. Estes são libertados através da estimulação das fibras neuronais tipo C por vanilóides, histamina ou prostaglandinas.⁶ Entre os mais importantes salientam-se a substância P, que pode facilitar a libertação de citocinas, estimular a produção de NO e radicais livres e o influxo de cálcio²⁸ e o neuropeptídeo Y²⁹.

2.2.8. Morte celular induzida pela isquémia

A lesão celular isquémica induz morte celular através de três mecanismos: necrose, apoptose e morte celular programa independente de caspases.

A necrose é o tipo de morte celular predominante nas áreas com maior grau de lesão ou de lesão mais precoce principalmente aquelas pertencentes ao foco isquémico. Este tipo de morte celular constitui uma fonte de mais lesão e de intensificação da resposta inflamatória local uma vez que as células em necrose libertam glutamato e outras toxinas lesivas.³⁰

A apoptose é um tipo de morte celular programada geneticamente e caracteriza-se por ser um processo com efeitos minimamente inflamatórios e com lesão apenas residual para as células circundantes.³¹ É característica de zonas com menor grau de lesão celular como aquele que é encontrado na zona de penumbra⁶ e ocorre, em primeiro lugar, devido a uma resposta celular à isquémia que se traduz por alterações da expressão do gene p53³² e Bcl-2³³ e é mediada por caspases. De salientar, que a isquémia activa, igualmente, outras vias de sinalização que induzem morte celular nomeadamente vias relacionadas com o JNK³⁴, c-jun³⁵, p38³⁶ e cdk-5³⁷. Vários aspectos determinam qual dos processos, necrose ou apoptose, ocorre com maior intensidade sendo que o local e grau de lesão celular isquémica, o grau de maturação celular, a concentração de Ca²⁺ intracelular e o microambiente celular são alguns deles.¹²

Um terceiro processo, e menos compreendido, é a morte celular programada independente de caspases que parece ter, também, um papel importante na resposta pós-isquémia.¹²

2.3 Mecanismos neuroprotectores

Embora a isquémia e conseqüente hipóxia leve, como foi descrito, a um conjunto de alterações que culminam em lesão e morte celular, a mesma é também responsável pela activação de inúmeros mecanismos neuroprotectores que tentam contrariar os mecanismos lesivos despoletados⁶, nomeadamente, aumento da expressão de HSP70³⁸, aumento da transcrição da família de genes BCL-2³⁹ e da proteína priónica, PrPc, que para além de inibir a forma activa da Bax, apresenta um papel importante na fosforilação da proteína cinase B que inibe a caspase 3⁴⁰ e, conseqüentemente, a via apoptótica²⁵.

2.3.1 Factores de crescimento neuronal

Os mais recentes estudos mostram que a capacidade adaptativa e de resposta à lesão pós-isquémica acontece tanto localmente, nos neurónios lesados e naqueles periféricos, como em áreas mais distantes não relacionadas topograficamente com a lesão.

O paradigma desta observação é a produção de factores de crescimento neuronais pela medula espinal que, ao modelar a plasticidade neuronal, podem contribuir para alguma recuperação sensoriomotora após o AVC.⁴¹ Assim, vários destes factores foram implicados, nomeadamente, o BDNF⁴², cujo papel crítico para o início da reorganização neuronal já foi descrito, o NT-3⁴¹, o VEGF-B⁴³, a IL-10⁴⁴ e o G-CSF⁴⁵.

2.3.2 Neurogénese e angiogénese

Os neurónios possuem potencial regenerativo após lesão sendo que esta plasticidade pode ser a chave para o desenvolvimento de terapêuticas que melhorem os resultados cognitivos e motores no período pós-AVC.

A neurogénese no adulto, ocorre principalmente na zona subgranular do hipocampo, na zona subventricular e no bulbo olfatório a partir de células estaminais neuronais que, sendo totipotentes, podem gerar tanto novos neurónios como também novas células da glia.⁴⁶ Parece claro, e foi demonstrado, que estes neuroblastos podem, sob determinados estímulos como a produção de SDF-1 α pelas células endoteliais, migrar para as zonas de lesão e, assim, ajudar na sua reparação.⁴⁷ Crucial para esta migração é o desenvolvimento de novos vasos que permitam o acesso destas células às áreas lesadas e criem o microambiente propício à sua regeneração. A angiogénese observada, que tem um carácter selectivo e específico às áreas de lesão com algum potencial de recuperação (zona de penumbra), serve também de mecanismo de limpeza e regeneração endotelial e vascular.⁴³ A partir de células endoteliais maduras ou de células progenitoras endoteliais provenientes da medula óssea, esta reorganização acontece e a mesma deve-se à acção de alguns factores de crescimento referidos anteriormente, nomeadamente, BDNF, VEGF, G-CSF e, também, FGF.⁴⁷

Diferenças sexuais na etiopatogenia do AVC

O AVC apresenta, consoante o sexo, diferentes padrões epidemiológicos e clínicos.

Mais concretamente, tem sido descrito e permanentemente observado ao longo dos anos que as mulheres têm, até aos 85 anos, um menor risco de doença cerebrovascular que os homens, diferença que apresenta uma completa reversão a partir desta idade.¹ Esta reversão é tão significativa que quando analisado o risco de AVC durante toda a vida, as mulheres apresentam um risco superior ao dos homens (20-21% contra 14-17%)¹. Pode, desde já inferir-se, através desta observação, que o sexo feminino apresenta durante a maior parte da vida algum tipo de protecção contra a isquémia, protecção potencialmente perdida com a progressão da idade. Clinicamente, observa-se, igualmente, diferenças sexuais, com as mulheres a terem piores resultados motores e cognitivos pós-AVC e a apresentarem maiores taxas de recorrência.²

Desta forma, parece claro que a existência de diferenças dependentes do sexo com expressão fisiopatológica significativa poderá estar na base deste dimorfismo sexual.

3.1 Mecanismos hormonais

3.1.1 O estradiol

É habitualmente reconhecido o papel do 17 β -estradiol enquanto hormona neuroprotectora, papel conseguido através da inibição da neurodegeneração associada às patologias neurológicas e ao envelhecimento.⁴⁸ Mais especificamente, no caso da isquémia, desde há muitos anos se inferiu o carácter benéfico desta hormona pela observação da incidência e da extensão do AVC em ratos em diferentes condições através do uso de técnicas de oclusão da artéria cerebral média para simular as condições isquémicas típicas desta patologia.

Um dos primeiros estudos neste âmbito observou a extensão da lesão isquémica em ratos fêmea ovariectomizados e não ovariectomizados após serem sujeitos ao modelo de oclusão da artéria cerebral média e concluiu que as fêmeas ovariectomizadas apresentavam uma lesão de extensão superior, facto revertido através da reposição estrogénica nestes animais.⁴⁹ Tal como foi referido anteriormente, a epidemiologia do acidente vascular cerebral em humanos também parece sugerir alguma protecção conferida pelos estrogénios às mulheres em idade reprodutiva. De qualquer das formas, aquilo que se observou, tanto laboratorialmente como em alguns ensaios clínicos levados a cabo em humanos, é que o efeito benéfico do estradiol apresenta-se restrito a uma dose específica e quando administrado num intervalo de tempo específico, condições que se não cumpridas podem, paradoxalmente, culminar na potenciação da lesão neuronal por parte desta hormona.^{2,48}

Embora a acção do estradiol em alguns tecidos possa ser receptor-independente (ver adiante), ao que parece grande parte do efeito neuroprotector específico desta hormona envolve a ligação a receptores específicos:

- ER α - é um receptor nuclear e factor de transcrição activado por ligante. Apresenta, também, funções independentes de ligante. É expresso em neurónios, células endoteliais e microglia e parece ser o receptor com um papel mais proeminente na protecção associada ao estrogénio.⁴⁸
- ER β - é estruturalmente e funcionalmente semelhante ao ER α e pode formar heterodímeros com este. É expresso em neurónio, astrócitos e microglia.
- GPR30/GPER - é o receptor menos estudado dos 3 mas apresenta evidência de ser, igualmente, neuroprotector. É expresso em neurónios e células endoteliais.

Os estudos mostram que apesar dos efeitos benéficos da activação destes receptores, o uso de agonistas sistémicos pode ter variados efeitos: em primeiro lugar pode não mimetizar o papel do estrogénio endógeno⁴⁸ ou tal pode apenas ser conseguido quando usados em muito baixas concentrações, em segundo lugar tais efeitos podem ser apenas conseguidos em machos e em terceiro e último lugar o efeito pode ser lesivo, piorando a incidência e a gravidade da lesão isquémica².

De salientar, ainda, que após a isquémia se observa um aumento da transcrição de ER α (principalmente), sugerindo a sua influência na fisiopatologia do AVC. Esta influência é indubitavelmente confirmada pela observação de lesões mais profundas e de maior gravidade em ratos *knock-out* de receptores estrogénicos em comparação com ratos normais.⁴⁸

3.1.1.1 Vias de sinalização dependentes de receptor

Tal como foi descrito antes tanto o ER α como o ER β são factores de transcrição de acção predominantemente nuclear. As hormonas femininas ligam-se a um domínio específico de ligação a ligante do receptor induzindo-lhe uma alteração conformacional que permite a exposição de sequências de localização nuclear, um conjunto de aminoácidos que funcionam como um marcador que possibilita a translocação para o núcleo e a homo ou heterodimerização dos receptores.⁵⁰ Uma vez no núcleo, estes receptores ligam-se a elementos de resposta ao estrogénio (uma sequência de nucleotídeos especificamente reconhecida por estes receptores) na região promotora dos genes alvo regulando, assim, a transcrição génica.⁵⁰

As vias activadas podem não ser sempre o resultado de alterações genómicas mas sim o produto da interacção com outras cascatas de sinalização, com transdução mais rápida de sinal e que podem, curiosamente, interagir com vias associadas a regulação transcripcional.⁴⁸

De qualquer forma, tanto a activação nuclear quanto extranuclear de diversas vias irá culminar em alterações nas vias de morte celular, na permeabilidade celular e mitocondrial, no fluxo iónico, no metabolismo celular e na libertação de neurotransmissores.⁴⁸

Estão descritas variadas alterações celulares, induzidas pelos estrogénios, quer a nível transcripcional quer a nível não transcripcional.

Relativamente às alterações transcripcionais pode-se referir o aumento da expressão de BDNF, VEGF, ERE e IGF-1, o aumento da expressão de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL, a diminuição da expressão de moléculas pró-apoptóticas como Bax e, por fim, numerosas alterações mitocondriais, nomeadamente, aumento da síntese de ATP, aumento da depuração das espécies reactivas de oxigénio e diminuição da libertação de citocromo c.⁴⁸ Quanto às alterações não transcripcionais pode-se referir o aumento da fosforilação de PCB e inibição da via MKL3/MKK4-7/JNK1-2 levando a diminuição do stress oxidativo, o aumento da activação de PI3K e MAPK e inibição de JNK e a interacção com a calveolina e receptores de glutamato com activação de vias de PLC/PKC/MAPK e aumento do influxo de cálcio e activação do canal VDAC, um canal aniónico dependente de voltagem.⁴⁸

3.1.1.2 Vias de sinalização independentes de receptor

Embora a maior parte dos efeitos neuroprotectores do estradiol estejam relacionados com a indução de vias moleculares através de receptores específicos, estão documentados alguns destes efeitos independentes da ligação desta hormona ao receptor. Mais concretamente, foi observado que certos compostos que apresentam baixa afinidade com os receptores de estradiol apesar de serem estruturalmente semelhantes a esta hormona poderiam ter algum papel na redução do stress oxidativo mitocondrial evitando, desta forma, a lesão celular.⁴⁸ Embora com alguma incerteza, pensa-se que a apolipoproteína E poderá estar na base destes efeitos mas mais estudos são necessários para aprofundar esta temática.⁵¹

3.1.1.3 O papel do estrogénio na inflamação

O estrogénio é uma molécula com grande potência anti-inflamatória. Observa-se em ratos fêmea ovariectomizados sujeitos a oclusão da artéria cerebral média um aumento da adesão leucocitária em comparação com ratos não ovariectomizados nas mesmas condições.⁵² Por outro lado, tem sido descrita a diminuição da actividade de NF- κ B, ikB-cinase, iNOS e da expressão de TNF α com efeitos neuroprotectores. De salientar que esta flutuação dos valores dos agentes pró-inflamatórios não é constante mas bifásica: em primeiro lugar ocorre aumento da sua expressão havendo, depois, uma diminuição progressiva.⁵³

Observou-se, também, em ratos machos submetidos previamente a terapia hormonal com estrogénios e, posteriormente, a oclusão da artéria cerebral média, uma redução do IL-1B e

uma diminuição da lesão cerebral.⁵⁴ Para além disto, em ratos de ambos os sexos tem sido reportada diminuição dos níveis de Iba cortical, da expressão de CD3 e supressão de CCL2/CCL5 pela exposição a estrogénio endógeno, o que sugere que os efeitos anti-inflamatórios são independentes do sexo.⁵³

Os efeitos anti-inflamatórios do estrogénio observam-se tanto em relação às células neuronais e inflamatórias locais como em relação aquelas que, entretanto, se infiltram após a ocorrência do AVC e são específicos consoante o tipo de célula.⁵³ Em relação aos astrócitos, ocorre aumento da expressão de transportadores de glutamato, diminuindo a excitotoxicidade produzida por este neurotransmissor e promoção da produção de prostaglandinas e VEGF estimuladoras da angiogénese.⁵³ Relativamente à microglia, esta hormona estimula a inactividade funcional destas células diminuindo a sua proliferação e migração, o que leva a diminuição da lesão cicatricial.⁵³ Supressão da libertação de quimiocina e citocinas pró-inflamatórias e diminuição do edema através de diminuição da expressão de aquaporinas são dois dos efeitos mediados pelo estrogénio e comuns às várias células gliais.⁵³ De notar, que em relação aos outros tipos celulares mais estudos deverão ser levados a cabo no sentido de se esclarecer objectivamente os verdadeiros efeitos das hormonas nas mesmas.

3.1.1.4 O papel do estrogénio na hemostase

O efeito neuroprotector do estrogénio ao nível da hemostase e da coagulação observa-se a dois níveis: em primeiro lugar, o mesmo relaciona-se com a inibição da aterogénese através da inibição da actividade dos macrófagos, célula com grande impacto na fisiopatologia da formação e ruptura da placa aterosclerótica, estrutura com um grande papel na etiologia do AVC. Observa-se a supressão da produção de citocinas, diminuição da captação de lipoproteínas e aumento do metabolismo e transporte celular do colesterol. Todos estes efeitos resultam numa maior estabilização da placa já formada e na inibição do seu desenvolvimento.⁵³

Em segundo lugar, as hormonas femininas exercem a sua acção no estado de hipercoagulabilidade já descrito e que se segue à agressão vascular observada no AVC. Desta forma, se por um lado reduzem a produção de ON e ATP pelas plaquetas e pelas células endoteliais diminuindo o seu recrutamento, adesão e agregação dificultando a formação de trombo, por outro, diminuem a transcrição dos genes associados aos factores de coagulação com acção anti-coagulante, nomeadamente, de proteína C, S, de PAI e de AT-III e aumentam a transcrição de factores pró-coagulantes como factor VII e factor XII contribuindo, portanto, para a progressão da lesão observada.⁵⁵

3.1.1.5 O papel do estrogénio na BHE

Experiências levadas a cabo em ratos ovariectomizados posteriormente tratados com estrogénio endógeno e submetidos a oclusão da artéria cerebral média mostraram menores alterações da permeabilidade da BHE e diminuição do edema associado.⁵⁶ Estudos posteriores, relacionaram a activação do ER β com o aumento da expressão de claudina-5, uma proteína que integra as *tight-junctions* encontradas na BHE, e inibição directa da acção de VEGF e diminuição da sua expressão através da inibição do seu factor de transcrição, a proteína HIF-1 α .⁵⁶ A activação quer de ER α como de ER β leva, também, a aumento da expressão de AQP4, uma aquaporina encontrada nos microvasos que revestem a barreira e que, enquanto principal canal aquoso desta zona, apresenta grande relevância na formação de edema.⁵⁶ Por último, a diminuição da produção de espécies reactivas de oxigénio e a diminuição da actividade de MMPs induzidas pelo estrogénio irão, igualmente, contribuir para a integridade desta barreira.⁵⁶

3.1.1.6 O papel do estrogénio no endotélio vascular

A descoberta de receptores de estrogénio tanto em células endoteliais⁵⁷ como em células musculares lisas⁵⁸ forneceu a derradeira prova do potencial papel desta hormona na regulação da função do endotélio vascular. Estudos subsequentes demonstraram que a acção do estrogénio depende, mais uma vez, da activação de vias tanto transcripcionais como não transcripcionais a vários níveis. Em primeiro lugar, esta molécula aumenta a síntese e libertação de ON que funciona como vasodilatador vascular, anti-inflamatório e anti-aterogénico. Isto acontece através do aumento da transcrição de eNOS e da estimulação da sua activação por mecanismos dependentes da fosforilação por MAP cinases, tirosina cinases, HSP90 e PCB/PI3K.⁵⁰ Em segundo lugar, é promotora da angiogénese através da estimulação da resposta endotelial ao FGF-2 e da activação de RhoA, gene/proteína que estimula a migração e proliferação celulares através do aumento da expressão de proteínas do ciclo celular como ciclina D1/CDK4, ciclina A2/CDK2 e ciclina B1/CDK1, respectivamente.⁵⁹ Ainda neste âmbito é importante o seu efeito enquanto potenciadora da expressão de integrinas, proteínas chave neste processo.⁶⁰ Em terceiro e último lugar, o estrogénio altera a expressão de moléculas de adesão endotelial, nomeadamente, de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, aumentando-a ou diminuindo-a conforme a dose e o período de exposição. Um estudo realizado em mulheres no período pós-menopausa com doença arterial coronária mostrou que a terapia de reposição hormonal levou a diminuição sérica de moléculas de adesão solúveis, aumentando, no entanto, a expressão de MMP-9.⁶¹

3.1.1.7 O papel do estrogénio no Homem

A neuroprotecção assegurada pelo estradiol está, como foi descrito, largamente provada tanto *in-vitro* como em modelos animais. Apesar disto, tem sido difícil entender quais os verdadeiros efeitos do estradiol na mulher e de que forma a intervenção nas vias hormonais poderá ser um alvo terapêutico. Algumas observações, epidemiológicas e clínicas, fornecem algumas pistas no sentido de responder a esta questão:

- Observa-se uma menor incidência de AVC em mulheres em idade fértil quando em comparação com os homens, taxa que aumenta e se inverte a partir da menopausa¹
- Observa-se um aumento do risco de doença cerebrovascular em mulheres com menopausa precoce ou cirúrgica ou menarca tardia⁶²
- Observa-se que a terapêutica de reposição hormonal pode ter efeitos ambíguos relativamente ao AVC:
 - ✓ Se iniciada precocemente após a perda do estrogénio endógeno apresenta efeitos benéficos⁴⁸
 - ✓ Se iniciada tardiamente pode incrementar ainda mais o risco já acrescido de AVC⁶²

Assim, perante estas observações contraditórias parece haver um período crítico e muito bem definido temporalmente no qual a introdução de hormonas exógenas deve ser iniciada.^{48,62}

3.2 Mecanismos não hormonais

Estudos em culturas celulares demonstraram que mesmo na ausência de estímulos hormonais os neurónios de ratos macho apresentavam um comportamento bioquímico distinto dos neurónios de ratos fêmea em resposta à lesão isquémica.² Esta diferença acontece principalmente a dois níveis: em primeiro lugar, na resposta e resistência aos estímulos lesivos e, em segundo lugar, no tipo de morte celular despoletada após a lesão.

3.2.1 Diferenças na resposta à lesão

Os neurónios dopaminérgicos de ratos fêmea apresentam maior resistência à exposição a concentrações tóxicas de dopamina e mais altas taxas de sobrevivência que os neurónios dopaminérgicos masculinos, estes últimos também apresentam maior susceptibilidade aos efeitos lesivos do glutamato e do peroxinitrato (embora a resposta ao peróxido de hidrogénio seja semelhante).

Por outro lado, os neurónios de ratos fêmea das zonas cortical e ventricular expressam mais cinases neuroprotectoras (PCB, p.e.) em comparação aos neurónios masculinos das mesmas zonas. Os astrócitos femininos apresentam maior resistência à privação de oxigénio e glicose².

3.2.2 Diferenças na via de morte celular

Nos ratos fêmea o mecanismo de morte celular predominante é independente de caspases. O mesmo relaciona-se com a activação de PARP como resposta à lesão do ADN induzida pelo ON. A PARP funciona como reparador do material genético num último esforço para garantir a sobrevivência da célula. A activação da PARP leva à translocação de AIF da mitocôndria para o núcleo levando a fragmentação do ADN e apoptose.^{63,64}

Nos ratos macho, as caspases são o principal mediador de morte celular. Tal como foi descrito anteriormente, a isquémia leva a um conjunto de alterações estruturais e metabólicas que culminam na libertação de citocromo c pela mitocôndria. Esta molécula, uma vez no citosol, leva à activação de APAF-1 e à formação de um aptossoma que activa a caspase 9. Seguidamente, há uma activação sucessiva de caspases que resulta em apoptose.^{63,64}

Recentemente, têm sido descobertas novas vias de morte celular associadas a neurónios isquémicos e estas parecem, igualmente, ter um impacto diferente consoante o sexo. Dentro destas, é de salientar a autofagia cujas evidências concluem que tem maior expressão em neurónios de ratos macho.²

O papel da epigenética na etiopatogenia do AVC

A epigenética tem como base de estudo as alterações do ADN ou da cromatina sem interferência na sequência de nucleótidos e com influência na expressão génica. Em resumo, pode simplificar-se dizendo que as alterações epigenéticas são fenotípicas e não genotípicas. Estas alterações podem ocorrer a três níveis: por metilação do ADN, com adição de um grupo metil entre um nucleótido citosina e um guanina imediatamente a seguir formando uma “ilha” CpG, por alteração das histonas através de metilação, acetilação ou ubiquitinação e pela acção de sequências de RNA não codificante.⁶⁵ Normalmente a metilação do ADN e a acção das sequências de RNA não codificante levam ao silenciamento de um determinado gene enquanto que as alterações nas histonas aumentam a sua expressão, factos que não são, no entanto, regra.⁶⁵ Ainda em relação à metilação, o processo bioquímico mais amplamente estudado neste âmbito, é digna de referência a influência da proteína MeCP2 e outras da mesma família que se ligam ao ADN metilado e que através do recrutamento de mais proteínas levam a alterações na condensação da cromatina e a repressão da expressão génica.

É importante dar relevância ao facto de que as alterações epigenéticas podem acontecer tanto em células da linha germinativa, tendo, portanto, potencial hereditário, como em células somáticas. Esta possibilidade de transmissão dessas alterações, algumas com potencialidade de levar ao desenvolvimento de doença, para as gerações futuras bem como o facto de que o ambiente e o estilo de vida poderem ser uma fonte das mesmas torna esta área de primordial importância.⁶⁶

Ao longo dos anos tem sido descrita a influência destas modificações na etiologia de um conjunto alargado de patologias como cancro, distúrbios e retardos mentais, doenças auto-imunes e síndromes pediátricas.⁶⁶ Também no AVC a epigenética tem efeito. Tal como foi visto anteriormente, após a isquémia observa-se, em ratos fêmea, um aumento da expressão de *Era* do lado da lesão cuja função é de mediar as acções neuroprotectoras do estrogénio.⁶⁷ Este aumento não se observa em ratos machos e é independente da suplementação de estrogénios exógenos.⁶⁸ Relativamente a estes receptores, os mesmos apresentam, em ratos, uma grande expressão após o nascimento, facto que mostra a sua importância no desenvolvimento cerebral pós-natal e que pode estar na base do diferente desenvolvimento e fenótipo cerebral de machos e fêmeas.⁶⁹ Essa expressão vai gradualmente diminuindo com a idade, sendo que no córtex adulto é baixa.⁷⁰ Estudos realizados com o intuito de perceber a razão deste declínio concluíram que com o avançar da idade e no período correspondente à diminuição da expressão de *Era*, a zona promotora do gene associado ao *Era* é progressivamente metilada e associada à proteína MeCP2, o que sugere a regulação deste receptor através de mecanismos epigenéticos.⁷¹

Quer isto dizer, que o aumento da expressão de receptores de estrogénio após a isquémia pode dever-se a mecanismos epigenéticos. Para esclarecer esta possibilidade foram realizados estudos para avaliar o grau de metilação da região promotora do gene do $E\alpha$ após a isquémia e observou-se que esta zona apresentava menor metilação em ratos fêmea sendo que em ratos macho não se observou qualquer alteração, mesmo quando submetidos a terapêutica estrogénica exógena ou quando o procedimento foi realizado em ratos fêmea ovariectomizados posteriormente tratados com este tipo de terapêutica.⁶⁸ De salientar, que no mesmo estudo se observou que a lesão neuronal leva a fosforilação da proteína MeCP2 e à sua dissociação do complexo CpG do promotor do $E\alpha$, reacção que pode despoletar os eventos subsequentes que culminam na maior expressão deste gene.⁶⁸ Estes resultados permitem concluir que as alterações epigenéticas observadas na etiopatogenia do AVC apresentam, também, dimorfismo sexual e que a resposta à lesão pode dever-se à actividade/inactividade de diferentes genes relacionados tanto intrinsecamente, com o sexo, como com a acção das hormonas.

Em resumo, pode afirmar-se que as modificações epigenéticas observadas no $E\alpha$ após o AVC são de primordial importância para a ocorrência de todos os efeitos neuroprotectores mediados pelo estrogénio sendo que a alteração desta regulação pode resultar em perda destes benefícios e no aumento da lesão. A noção da susceptibilidade destas vias à acção de componentes ambientais ou a comportamentos individuais prejudiciais abre um admirável mundo novo na procura de novas etiologias para este velho problema.

O papel dos disruptores endócrinos na etiopatogenia do AVC

5.1 Conceitos gerais

Os disruptores endócrinos (DE) são substâncias químicas sintéticas ou naturais presentes em pesticidas, plásticos ou solventes que ao serem absorvidos pelo corpo mimetizam ou antagonizam os efeitos das hormonas endógenas alterando os seus ciclos com repercussões na saúde dos indivíduos.⁷² A sua presença é ubiqüitária nos objectos de plástico do dia-a-dia, no papel, na água e na alimentação e a exposição aos mesmos, ainda que em pequenas quantidades, pode ser nociva. A absorção pode fazer-se por ingestão, inalação⁷³ ou de forma transdérmica⁷⁴ o que mostra a grande vulnerabilidade do ser humano à presença destes agentes: a avaliação da sua presença na urina de algumas amostras da população detectou a presença de metabolitos destas moléculas em cerca de 90% dos indivíduos.⁷⁵

Foram levados a cabo estudos no sentido de se entender de que forma é que estes compostos, uma vez no organismo, se distribuem e os resultados são surpreendentes: foram detectados níveis mensuráveis no sangue (tanto no plasma como no soro), no leite materno, no líquido amniótico, na placenta e na urina, o que mostra a sua possível influência tanto na vida adulta e infância como na vida intra-uterina.⁷⁵ Quanto ao seu metabolismo, há poucos dados em relação ao ser humano devido ao facto da sua exposição ser mais crónica e associada a menores concentrações, factos que dificultam esta avaliação. É importante notar que tal como as hormonas, os disruptores endócrinos não necessitam de elevadas concentrações para exercerem os seus efeitos sendo que as suas curvas dose-efeito não são lineares. De qualquer das formas, os seus potenciais efeitos nocivos no adulto acontecem em concentrações mais elevadas do que nas crianças sendo que nestes dois grupos estes efeitos podem ser eliminados ou amenizados através da remoção da exposição ao químico. O mesmo não é verdade quando consideramos a acção destas moléculas em fetos, sendo que os seus efeitos durante o desenvolvimento podem perpetuar-se para o resto da vida mesmo quando a exposição já não aconteça, facto que reveste este assunto de particular importância.⁷²

O primeiro efeito associado a estes agentes foi a modulação de receptores hormonais nucleares, no entanto, estudos subsequentes mostraram que os mesmos podem exercer a sua acção de forma muito variada modulando, também, receptores não esteróides, interferindo na acção de co-activadores transcripcionais e em vias enzimáticas e exercendo uma acção directa nos genes ou no DNA produzindo, através deste último mecanismo, alterações epigenéticas significativas e com potencial transgeracional.⁷²

Todos estes efeitos parecem ter algum papel num conjunto de patologias, quer em adultos quer em crianças: neoplasias, obesidade, síndrome metabólica, diabetes e outros distúrbios endócrinos, distúrbios cardiovasculares e cerebrovasculares, patologias auto-imunes, asma, doença de Alzheimer e doença de Parkinson.⁷² É de salientar que muitas destas patologias têm a sua relação com os DE não através da exposição aos mesmos na idade adulta ou na infância mas sim pela exposição intra-uterina e pela indução, por parte destes compostos, de alterações do desenvolvimento que culminarão, após o nascimento e durante a vida, em doença.^{72,76}

Há uma variedade grande de moléculas com efeitos de disrupção endócrina como a dioxina e compostos derivados, a DDT, o bisfenil policlorado, o bisfenol A e o ftalato. Esta revisão irá incidir, principalmente, nestes três últimos, encontrados em aparelhos electrónicos, em certos tipos de papel e em plásticos, entre outros.

5.2 Os disruptores endócrinos e o estradiol

Tal como foi apontado anteriormente, os DE alteram a normal fisiologia dos sistemas endócrinos. Com efeito, podem afectar a biossíntese, metabolismo e transporte das hormonas, podem modular a sua interacção com os respectivos receptores específicos e, por último, conseguem alterar a expressão génica através de diversos mecanismos.⁷⁷ Embora estejam descritas alterações relativas à maior parte dos sistemas hormonais, esta revisão irá centrar-se na relação dos DE com o estradiol dada a grande relevância desta hormona para a fisiopatologia do AVC.

Disruptores endócrinos como o BPA, os ftalatos ou o bisfenil policlorado apresentam estruturas químicas muito semelhantes àquelas apresentadas pelo estradiol, facto que permite classificá-los em xenoestrogénios. Desta forma, poderão, virtualmente, ligar-se aos mesmos transportadores, serem metabolizados pelas mesmas enzimas e activarem/inibirem os mesmos receptores. A influência dos DE ao nível da esteroidogénese do estradiol observa-se a vários níveis: em primeiro lugar, tanto o BPA quanto os ftalatos parecem inibir, após longos períodos de exposição, a actividade da aromatase, enzima que converte os androgénios em estrogénios, resultando numa menor produção destes últimos.⁷⁸ Em segundo lugar, observa-se alteração da actividade da 17 β -HSD, a desidrogenase que converte a hormona estrona na forma biologicamente activa, o estradiol, mecanismo que acontece principalmente em tecidos periféricos e nos quais a acção do estradiol se observa. Em terceiro lugar, os DE podem interagir com o receptor PXR, um receptor nuclear que codifica um conjunto de genes importantes no metabolismo de substâncias tóxicas. O que se observa é que desta interacção podem ser produzidos metabolitos activos e mais potentes com função xenoestrogénica e que podem amplificar a disrupção endócrina.⁷⁹ Por último, estão descritos

efeitos em que na maioria das enzimas associadas à síntese de androgénios e que, indirectamente, irão afectar também a produção de estrogénios.⁷⁷

Apesar da grande similaridade, aquilo que se observa é que os DE não têm os mesmos efeitos das hormonas endógenas alterando, portanto, a função destas últimas e produzindo, potencialmente, doença. Estudos realizados mostram que o BPA activa os receptores estrogénicos ER α , ER β e outros receptores membranares da mesma forma que os estrogénios o fazem, no entanto, altera a transcrição de genes diferentes daqueles que são activados pelas hormonas endógenas. Isto leva a que não sejam activados os genes típicos (devido à inibição competitiva pelo DE) e a que se aumente a transcrição de outros genes que, naturalmente, deveriam estar silenciados. Por outro lado, observa-se também, a maiores concentrações, a activação de outros receptores nucleares.⁷² Estudos em linhas celulares mostraram um conjunto de outras alterações tanto genómicas quanto não genómicas: aumento da libertação de cálcio intracelular, activação das vias de cAMP, cGMP e fosforilação do CREB (com aumento da expressão de c-fos e c-jun), activação de MAPK/ERK, PI3 e PCC, activação da cinase cálcio/calmodulina II e activação da caspase JNK.⁸⁰

5.3 Os disruptores endócrinos e o AVC

Dados epidemiológicos recentes associam a exposição e absorção de disruptores endócrinos a uma maior incidência de doenças cardiovasculares.⁸¹ Mais concretamente, um estudo nacional com uma larga amostra levado a cabo nos EUA mostrou uma clara relação entre a concentração urinária de ftalatos e a incidência de AVC.⁸² O mesmo resultado foi observado em mulheres com exposição dietética a estes compostos.⁸³ Por último, estas moléculas parecem ser uma causa de menopausa precoce, condição que constitui um factor de risco para o desenvolvimento de acidente isquémico através da redução da janela temporal protectora do estrogénio.⁸⁴ É ainda de salientar que os DE estão na base de muitas patologias que constituem factores de risco para o desenvolvimento de doença cerebrovascular, nomeadamente, de diabetes, síndrome metabólico, hipertensão, hipercolesterolemia e aterosclerose⁸³, o que pode, por si só relaciona-los, ainda que indirectamente, com o aumento da incidência de AVC. Ainda assim, apesar da grande magnitude destes dois problemas e da relação epidemiológica já estabelecida entre os mesmos ainda não estão estabelecidos com clareza os mecanismos bioquímicos e moleculares específicos e de relação directa que explicam este fenómeno. Apesar disso, têm sido descritos vários efeitos dos disruptores endócrinos em células neuronais, no endotélio, na inflamação e noutros elementos também comuns a muitas etapas da fisiopatologia do AVC.

Assim, serão descritos esses efeitos atribuídos aos DE e que, simultaneamente, podem explicar a sua relação com o distúrbio cerebrovascular referido.

5.3.1 Efeitos nas células neuronais

Os efeitos dos DE nas células neuronais apresentam uma grande variabilidade consoante a molécula considerada e os estudos desenvolvidos. Com efeito, as investigações levadas a cabo recentemente mostram resultados verdadeiramente paradoxais acerca do influência destes compostos na lesão isquémica.

Estudos realizados em linhas celulares neuronais mostraram que tanto o BPA como o PCB induzem a apoptose celular por mecanismos independentes de receptor (mas dependentes de canais iónicos) através da activação da via MAPK/ERK, com recrutamento da caspase 3.⁸⁵ Por outro lado, o tratamento com PCB em ratos mostrou diminuição do nível de enzimas antioxidantes no hipotálamo, nomeadamente superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e esterase da acetilcolina.⁸⁶ No entanto, estão também descritos efeitos anti-apoptóticos mediados por estes compostos, conseguidos pela diminuição do stress oxidativo.⁸⁵ Um estudo inovador que se propôs relacionar a exposição *in-útero* ao PCB com a gravidade da lesão isquémica na vida adulta mostrou que o volume da área de enfarte era menor tanto em ratos fêmea como em ratos macho expostos a este DE o que mostra que o mesmo pode ter uma acção neuroprotectora. Embora ainda não esteja esclarecida a razão deste fenómeno, a explicação mais plausível centra-se num possível mecanismo sinérgico entre esta molécula e os estrogénios.⁸⁷ Dados apontam que a exposição ao PCB durante o desenvolvimento intra-uterino aumenta a sensibilidade aos efeitos do estradiol na vida adulta e tem algum papel no desenvolvimento do dimorfismo cerebral⁸⁷, o que coincide com os resultados deste estudo visto que em fêmeas foi necessária uma menor concentração do composto sintético para se induzir neuroprotecção. Apesar deste facto, uma investigação epidemiológica já citada relativa à exposição dietética aos PCB encontrou uma associação significativa com um aumento da incidência e da gravidade dos AVCs, o que constitui, mais uma vez, um paradoxo. Esta disparidade de resultados pode dever-se ao facto dos efeitos dos PCBs se estenderem para lá das alterações nas células neuronais. Tal como será referido adiante, as referidas moléculas estão associados ao desenvolvimento de diabetes e doença vascular, dois factores de risco cruciais para o desenvolvimento de acidente isquémico.⁸⁷ Quer isto dizer que seus efeitos neuroprotectores celulares podem ser suplantados pelo seu carácter lesivo enquanto promotores de factores que aumentam o risco de AVC e pioram a sua gravidade. Tal facto, é reforçado pela observação de que no estudo laboratorial referido não ter havido exposição ao DE após o nascimento não permitindo, por isso, esclarecer esta dúvida.

Tal como foi descrito anteriormente, após a isquémia observa-se um aumento da expressão de receptores estrogénicos, nomeadamente de ER α , importantes para mediar os efeitos neuroprotectores do estrogénio. Desta forma, a observação de que os DE podem alterar esta expressão pode nos dar algumas pistas acerca do seu papel nos eventos que sucedem a ocorrência de AVC. Com efeito, embora o BPA possa ter efeitos estrogénicos, alguns estudos

mostram que a determinadas concentrações o mesmo pode ter, igualmente, efeitos anti-androgénicos, ambos dependentes e independentes de receptor.⁸⁸ Por outro lado, mostrou-se que a exposição a este composto em ratos macho durante o desenvolvimento resulta na diminuição da transcrição de mRNA associado ao ER α e na diminuição da expressão deste receptor no hipocampo.⁸⁹ Esta modulação está associada ao desenvolvimento de alterações cognitivas na idade adulta, facto que sugere que esta disrupção pode ter significado durante toda a vida do indivíduo. Também é importante notar que se observa uma inibição da actividade da aromatase com diminuição da produção de estrogénio.⁸⁹ Por último, esta molécula sintética pode alterar a afinidade da ligação do estradiol aos seus receptores.⁸⁹ Também a expressão do ER β pode ser diminuída após a exposição aos DE, neste caso, aos PCBs.⁹⁰ Mais estudos deverão ser levados a cabo para perceber se estes fenómenos acontecem igualmente em ratos fêmea e de forma é que os mesmos são despoletados especificamente após a isquémia.

As diferentes respostas celulares, algumas benéficas outras lesivas, à acção dos DE poderão dever-se, tal como já foi descrito, à concentração do composto e ao tempo de exposição. No entanto, parece também haver alguma susceptibilidade individual ao seu efeito. Um estudo que relacionava a exposição aos ftalatos com o desenvolvimento de leiomioma, uma neoplasia hormono-dependente, mostrou que o risco de desenvolvimento de patologia era apenas maior para indivíduos homozigóticos para o alelo C do ER α e do CYP17A1, sendo que nos outros genótipos esta relação não era significativa.⁹¹ A realização deste tipo de investigações em células neuronais pode ser crucial para clarificar a razão pela qual os resultados da exposição aos DE são tão diferentes ou mesmo paradoxais nos vários estudos observados.

Por último, é importante referir a grande disrupção endócrina mediada por estes químicos sintéticos em larga escala mas que pode ter efeito a nível celular. Os DE levam a alteração da produção de libertação de GnRH e das suas hormonas associadas.⁹² Tal facto, leva a que haja alteração dos mecanismos de feedback e alteração dos ciclos fisiológicos e rigorosamente controlados destas hormonas. Ao ter-se consciência de que o resultado final destas alterações será uma modificação dos níveis de estrogénios e androgénios cujos efeitos nas células neuronais são de primordial importância na resposta ao AVC, prevemos que estas mesmas alterações vão levar a modulação, muito provavelmente lesiva, dessa resposta.

5.3.2 Efeitos na inflamação

A exposição ao BPA leva a alterações na resposta inflamatória e imune, tanto celular quando humoral. Os seus efeitos são específicos para os vários tipos de células que integram esta resposta: relativamente aos linfócitos T CD4+, observa-se aumento da produção de INF γ e de IL-4. Quando aos linfócitos B, observa-se uma estimulação da sua proliferação e um aumento da secreção de IgG e de IgA. Por último, apresenta um efeito bifásico nos macrófagos,

podendo aumentar ou diminuir a produção de TNF α e de ON dependendo da dose considerada. Ainda de salientar, que o BPA actua como antagonista do receptor nuclear AhR. Considerando a sua acção reguladora de genes associados a proteínas com função anti-inflamatória, a antagonização desta função terá, portanto, um efeito pró-inflamatório.⁹³ Também em relação aos PCBs estão descritos efeitos promotores e intensificadores da inflamação como activação do factor NF- κ B e incremento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6. Assim, ainda que mais estudos sejam necessários nesta temática, é obvio o papel dos DE na estimulação e sustentação da resposta inflamatória. Tendo em conta a relevância desta resposta na cascata isquémica, parece bastante forte a associação indirecta destes compostos com a etiopatogenia do AVC.

5.3.3 Efeitos nas células endoteliais

Os DE podem ter algum papel na disfunção do endotélio vascular e no desenvolvimento de aterosclerose. Vários estudos têm sido levados a cabo neste sentido focando-se, principalmente, nos PCBs. Os mecanismos através dos quais tais fenómenos acontecem são vários, nomeadamente: aumento do stress oxidativo celular pela activação da via JNK com diminuição da actividade da glutathiona peroxidase, activação do factor NF- κ B, aumento da produção de IL-6 e aumento da expressão de VCAM e ICAM.⁹⁴ Também em relação ao BPA estão descritos efeitos semelhantes.⁹⁵ Todos estes processos são fulcrais para a fisiopatologia da aterogénese e podem sustentar a resposta inflamatória lesiva observada após o AVC.

5.3.4 Efeitos na angiogénese e na sinaptogénese

Estudos recentes mostram que o BPA, em concentrações semelhantes aquelas detectadas em seres humanos, exhibe características pró-angiogénicas através do aumento da transcrição dos genes associados ao VEGF, eNOS e Cx43 e pela estimulação da produção de ON. Apesar da angiogénese ser benéfica quando se consideram as etapas de recuperação celular após o AVC, a verdade é que este efeito protector pode ser ultrapassado pelo papel deste fenómeno no desenvolvimento de doença vascular, diabetes ou obesidade, factores de risco com um peso muito mais significativo para a ocorrência e gravidade do acidente isquémico.⁹⁵

Relativamente à sinaptogénese, já foi referido anteriormente que o cérebro tem capacidade de reestruturar as suas ligações neuronais após uma determinada lesão, fenómeno denominado plasticidade. Para que tal aconteça é necessário haver estimulação das células do hipocampo e córtex pré-frontal pelas hormonas sexuais. Neste sentido, observou-se que o BPA bloqueia a resposta sinaptogénica tanto das hormonas femininas quanto das hormonas masculinas. Estes dados têm, portanto, bastante importância pois mostram que a exposição a este composto pode diminuir a capacidade de recuperação e adaptação após a isquémia.⁹⁶

5.3.5 Efeitos epigenéticos

Um dos factos mais alarmantes relativos aos disruptores endócrinos é a sua capacidade de induzir alterações epigenéticas.⁹⁷ As mesmas podem acontecer tanto na vida adulta como durante os estágios de desenvolvimento intra-uterino com manifestação mais tarde podendo, também, ter um potencial carácter hereditário. Mais concretamente, estão descritas alterações epigenéticas relativas à expressão dos genes associados aos receptores de estrogénios mediada pela exposição intra-uterina ao BPA: observa-se disrupção dos padrões normais de metilação do ADN associados a todos os receptores estrogénicos com diminuição da sua expressão na idade adulta.⁹⁸

Considerando, por um lado, que a expressão constitutiva deste tipo de receptores é um dos mecanismos neuroprotectores mais evidentes face à lesão isquémica e, por outro, que o aumento da sua expressão após a mesma pode dever-se, como já descrito, a mecanismos epigenéticos é clara a evidência de que os DE podem através da modulação epigenética destas duas vias diminuir a sua expressão e o seu valor benéfico em relação ao AVC.

Conclusão

Tal como foi descrito ao longo deste trabalho, as hormonas sexuais são responsáveis pela regulação de um conjunto muito extenso de processos ao nível das células neuronais exercendo, por isso, funções de primordial importância.

Tal facto é particularmente verdade no contexto da lesão isquémica associada ao AVC: através da acção das hormonas sexuais, mais concretamente por acção do estrogénio, observa-se a activação de um conjunto alargado de mecanismos neuroprotectores que através da redução do stress oxidativo, da inibição da inflação, da manutenção de uma BHE íntegra ou da inibição das vias de morte cerebral permitem minimizar a extensão e a gravidade das lesões cerebrais observadas. Todavia, a maioria da informação disponível acerca deste tema é relativa a estudos realizados em animais, ratos e primatas, havendo, por enquanto, muito pouca informação relativa à sua acção concreta no Homem. Considerando a particular observação epidemiológica que confere ao estrogénio um carácter benéfico também no Homem, mais estudos deverão ser levados a cabo com o objectivo último de se entender, de forma rigorosa e precisa, de que forma é que se poderá usar as referidas hormonas ou os seus derivados como armas terapêuticas no combate à doença cerebrovascular.

Os eixos hormonais, em particular os eixos hormonais sexuais, permitem a produção, distribuição e acção das hormonas de uma forma rigorosamente regulada. No entanto, a complexidade associada a estes processos torna-os particularmente susceptíveis de alterações que podem, em alguns casos, produzir doença. Neste sentido, os DE podem alterar a biossíntese, metabolismo ou acção hormonal mimetizando ou antagonizando os seus efeitos, o que leva, em última análise, a rotura da homeostasia hormonal intrínseca. No caso particular do AVC, vários estudos demonstram a partilha, por parte dos DE e dos estrogénios, das mesmas etapas fisiopatológicas e a sua intervenção exactamente nos mesmos processos bioquímicos, o que permite concluir a importância do estudo destes compostos, facto que é reforçado pela sua presença quase universal na vida do Homem. A verdade é que há, ainda, um longo caminho a percorrer nesta área visto que há uma grande quantidade de moléculas com acção disruptora e com diferentes efeitos relativamente às células e aos processos bioquímicos neuronais. Com efeito, estão descritos efeitos lesivos por parte destes compostos mas também são identificadas acção benéficas pelo que é necessário clarificar com profundidade quais os seus reais efeitos. Por outro lado, as curvas dose-efeito relativas aos DE não são lineares, sugerindo que os supracitados efeitos são paradoxalmente contrários consoante a concentração considerada, o que dificulta, ainda mais a investigação nesta matéria exigindo, em conclusão, mais esforços e mais estudos nesta área.

Referências Bibliográficas

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. *Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A Report from the American Heart Association.*; 2014:161-173.
2. Zuo W, Zhang W, Chen N-H. Sexual dimorphism in cerebral ischemia injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2013;711(1-3):1-5.
3. Shah S. *Stroke Pathophysiology.*; 2010:1.
4. Miguel R. Prevenção do Acidente Vascular Isquémico Recorrente e Controlo dos Factores de Risco. *Rev. Factores Risco* 2007:44-52.
5. Ferreira R, Neves R, Rodrigues V. *Doenças Cérebro-Cardiovasculares Em Números - 2014.*; 2014:12-13.
6. Deb P, Sharma S, Hassan K. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 2010;17(3):197-218.
7. Brounsa R, Deyna PP De. The complexity of neurological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2009;111(6):483-495.
8. Katsura K, Kristian T, Siesjo BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 1994;22:991-996.
9. Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* 2008;39(11):3042-3048.
10. D.W.Choi. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 1995;18:58-60.
11. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J Physiol.* 1996;271:1424-1437.
12. Brouns R, Deyn PP De. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2009;111(6):483-495.
13. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998;29:2189-2195.
14. Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol.* 1985;68:122-129.
15. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, Zoppo GJ del. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995;26:2120-2126.
16. Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1996;739:88-96.

17. Zoppo GJ del, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res* 2000;98:73-81.
18. Rapela CE, Green HD. Autoregulation of canine cerebral blood flow during hypercarbia and during hypocarbia and during controlled (H+). *Circ Res* 1964;15:205-215.
19. Andresen J, Shafi NI, Jr. RMB. Endotelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 2006;100:318-332.
20. Georgiadis D, Schwarz S, Evans DH, Schwab S, Baumgartner RW. Cerebral autoregulation under moderate hypothermia in patients with acute stroke. *Stroke* 2002;33:3026-3029.
21. Brouns R, Heylen E, Sheorajpanday R, Willemse JL, Kunnen J, Surgeloose D De. Carboxypeptidase U (TAFIa) decreases the efficacy of thrombolytic therapy in ischemic stroke patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2009;111:165-170.
22. Kumar A, Dogra S. Pathophysiology and therapeutic strategies in the management of stroke: an update. *Drugs Today* 2008;44:757-766.
23. Kostulas N, Pelidou SH, Kivisäkk P, Kostulas V. Increased IL-1beta, IL-8, and IL-17 mRNA expression in blood mononuclear cells observed in a prospective ischemic stroke study. *Stroke* 1999;30:2174-2179.
24. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, et al. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke* 2008;39:2560.
25. Weise J, Sandau R, Schwarting S, et al. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 2006;37:1296-1300.
26. Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. Microglia and macrophages are the major sources of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:53-65.
27. Cechetto DF. Role of nuclear factor kappa B in neuropathological mechanisms. *Prog Brain Res* 2001;132:391-404.
28. Persson MG, Hedqvist P, Gustafsson LE. Nerve-induced tachykinin-mediated vasodilation in skeletal muscle is dependent on nitric oxide formation. *Eur. J. Pharmacol.* 1991;205:295-301.
29. Askalan R, Laughlin S, Mayank S, et al. Chickenpox and stroke in childhood: a study of frequency and causation. *Stroke* 2001:1257-1262.
30. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull* 1998;46:281-309.
31. D.W.Choi. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:667-672.
32. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 2003;11:577-590.

33. Joza N, Susin SA, Daugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;401:549-554.
34. Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* (80-.). 1995;267:389-393.
35. Hayashi T, Sakai K, Sasaki C, Zhang WR, Warita H, Abe K. JNK and JIP response in rat brain after transient MCAO. *Neurosci. Lett.* 2000;284:195-199.
36. Barone FC, Parsons AA. Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2000;9:2281-2306.
37. Green SL, Kulp KS, Vulliet R. Cyclin-dependent kinase 5 activity increases in rat brain following ischaemia. *Neurochem. Int* 1997;31:617-623.
38. Giffard RG, Yenari MA. Many mechanisms for HSP70 protection from cerebral ischaemia. *J. Neurosurg. Anesth.* 2004;16:53-61.
39. L L, PF C, P J, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007;12(5):887-896.
40. A H, O E, C P, et al. Reduced Apoptosis by Ethanol and Its Association with PKC- δ and Akt Signaling in Ischemic Stroke. *Aging Disord.* 2014;5(6):366-372.
41. Sista B, Fouada K, Winshipa IR. Plasticity beyond peri-infarct cortex: Spinal up regulation of structural plasticity, neurotrophins, and inflammatory cytokines during recovery from cortical stroke. *Exp. Neurol.* 2014;252:47-56.
42. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 2007;49:93-102.
43. Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis - A Harmonized Target for Recovery After Stroke. *Stroke* 2012;43:2270-2274.
44. Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit. Rev. Immunol* 2001;21:427-449.
45. The haematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest* 2005;115:2083-2098.
46. T H. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* 2009;15(1):20-27.
47. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11(3):298-308.
48. Schreihofner DA, Ma Y. Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: Who, what, where, and when? *Brain Res.* 2013;1514:107-122.
49. Yamori Y. Proceedings: Experimental studies on sex difference in stroke-prone SHR (SHRSP): hypoxic vulnerability and aortic brittleness. *Jpn Hear. J.* 1976;17:404-406.
50. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 2004;69:537-542.

51. James R, Searcy JL, Le Bihan T, et al. Proteomic analysis of mitochondria in APOE transgenic mice and in response to an ischemic challenge. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32(1):164-76.
52. Santizo, R.A., Anderson S, Ye S, Koenig HM, Pelligrino D. Effects of estrogen on leukocyte adhesion after transient forebrain ischemia. *Stroke* 2000;31:2231-2235.
53. Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex, stroke , and inflammation: The potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Horm. Behav.* 2013;63(2):238-253.
54. Chiappetta O, Gliozzi M, Siviglia E, et al. Evidence to implicate early modulation of interleukin-1beta expression in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol in male rats undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Int. Rev. Neurobiol* 2007;82:357-372.
55. Reilly MR, McCullough LD. Sex differences in stroke : The contribution of coagulation. *Exp. Neurol.* 2014;259:16-27.
56. Shin JA, Yang SJ, Jeong SI, Park HJ, Choi Y, Park E. Activation of estrogen receptor beta reduces blood-brain barrier breakdown following ischemic injury. *Neuroscience* 2013;235:165-173.
57. CD V, AB R, DE. V. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 1996;94:727-733.
58. RH K, BL P, ME M. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 1994;89:1943-1950.
59. Oviedo PJ, Sobrino A, Laguna-fernandez A, et al. Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;335(2):96-103.
60. Cid MC, Schnaper HW, Kleinman HK. Estrogens and the Vascular Endothelium. 2002;157:143-157.
61. Zanger D, Yang BK, Ardans J, et al. Divergent Effects of Hormone Therapy on Serum Markers of Inflammation in Postmenopausal Women With Coronary Artery Disease on Appropriate Medical Management. 2000;36(6):4-9.
62. Turtzo LC, McCullough LD. Sex-specific responses to stroke. *Future Neurol.* 2010;5(1):47-59.
63. Manwani B, McCullough LD. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens Heal.* 2007;7(3):319-339.
64. Liu F, Li Z, Li J, Siegel C, Yuan R. Sex Differences in Caspase Activation after Experimental Stroke. *Stroke* 2009;40(5):1842-1848.
65. McCarthy MM, Auger AP, Bale TL, et al. The Epigenetics of Sex Differences in the Brain. *J Neurosci.* 2009;29(41):12815-12823. doi:10.1523/JNEUROSCI.3331-09.2009.The.
66. R.L. J, M.K. S. Environmental epigenomics and disease susceptibility. 8, 253-262 (2007). *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:253-262.

67. Dubal DB et al. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* 2006;147:3076-3084.
68. Westberry JM, Prewitt AK, Wilson ME. Epigenetic regulation of the estrogen receptor alpha promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience* 2008;152(4):982-989.
69. Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex Differences in Epigenetic Regulation of the Estrogen Receptor- α Promoter within the Developing Preoptic Area. *Endocrinology* 2014;151(May 2010):2297-2305. doi:10.1210/en.2009-0649.
70. AK P, ME. W. Changes in estrogen receptor-alpha mRNA in the mouse cortex during development. *Brain Res* 2007; 1134 62-69. 2007;1134:62-69.
71. Wilson ME, Westberry JM. Regulation of Oestrogen Receptor Gene Expression : New Insights and Novel Mechanisms. *Neuroendocrinology* 2009:238-242.
72. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011;127(3-5):204-215.
73. Liao C, Kannan K. High levels of bisphenol A in paper currencies from several countries, and implications for dermal exposure. *Environ. Sci. Technol.* 2011;45(16):6761-8.
74. Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 2011;82(3):424-30.
75. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons W V. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 2007;24(2):139-77.
76. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, S. Fushiki. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A,. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;376(3):563-567.
77. Hampl R, Kubátová J, Stárka L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014;9:152-161.
78. Whitehead S a, Rice S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;20(1):45-61.
79. Mikamo E, Harada S, Nishikawa J, Nishihara T. Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003;193(1):66-72.
80. Tilghman SL, Nierth-Simpson EN, Wallace R, Burow ME, McLachlan J a. Environmental hormones: Multiple pathways for response may lead to multiple disease outcomes. *Steroids* 2010;75(8-9):520-3.
81. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease : Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010;5(1):71-80.
82. Shiue I. Urine phthalate concentrations are higher in people with stroke: United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), 2001-2004. *Eur. J. Neurol.* 2013;20(4):728-31.

83. Bergkvist C, Kippler M, Larsson SC, et al. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls is associated with increased risk of stroke in women. *J. Intern. Med.* 2014;276(3):248-59.
84. J A, J R, T K, A B. Age at natural menopause and exposure to organochlorine pesticides in Hispanic women. *J Toxicol Env. Heal. A.* 2004 Sep 24;67(18):1407-22. 2004;67(18):1407-1422.
85. D H, G F, F P, C. S. Effects of estrogens and endocrine-disrupting chemicals on cell differentiation-survival-proliferation in brain: contributions of neuronal cell lines. *J Toxicol Env. Heal. B Crit Rev.* 2011;14(5-7):300-27 2011;14(5-7):300-327.
86. Walker DM, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals and the Brain. In: *The Basic Biology of Endocrine Disruption.*; 2007:63-106.
87. Dziennis S, Yang D, Cheng J, et al. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls influences stroke outcome in adult rats. *Environ. Health Perspect.* 2008;116(4):474-80.
88. Alonso-magdalena P, Ropero AB, Soriano S, et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;355(2):201-207.
89. Xu X, He Y, Song C, et al. Bisphenol A Regulates the Estrogen Receptor Alpha Signaling in Developing Hippocampus of Male Rats Through Estrogen Receptor. *Hippocampus* 2014;11:1-11.
90. Swedenborg E, Pongratz I. Endocrine disruptors targeting ERbeta function. *Int. J. Androl.* 2010;33:288-297.
91. Huang P-C, Li W-F, Liao P-C, Sun C-W, Tsai E-M, Wang S-L. Risk for estrogen-dependent diseases in relation to phthalate exposure and polymorphisms of CYP17A1 and estrogen receptor genes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2014;21(24):13964-73.
92. Gore AC. Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Horm.* 2010;9(1):16-27.
93. Rogers J a, Metz L, Yong VW. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 2013;53(4):421-30.
94. Hennig B. Proinflammatory Properties of Coplanar PCBs: In Vitro and in Vivo Evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002;181(3):174-183.
95. Andersson H, Brittebo E. Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Arch. Toxicol.* 2012;86(3):465-74.
96. Hajszan T, Leranath C. Bisphenol A interferes with synaptic remodeling. *Front Neuroendocr.* 2011;31(4):519-530.
97. Kundakovic M, Champagne FA. Epigenetic Perspective on the Developmental Effects of Bisphenol A. *Brain Behav Immun* 2013;25(6):1084-1093.
98. Kundakovic M, Gudsnuik K, Franks B, Madrid J, Miller RL, Perera FP. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *PNAS* 2013;110(24).